

PCT
 ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
 Bureau international


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/78, 31/70	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/25524 (43) Date de publication internationale: 28 septembre 1995 (28.09.95)
--	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00326

(22) Date de dépôt international: 17 mars 1995 (17.03.95)

(30) Données relatives à la priorité:
 94/03194 18 mars 1994 (18.03.94) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LVMH RECHERCHE [FR/FR]; 25, rue des Peupliers, F-92752 Nanterre (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MEYBECK, Alain [FR/FR]; Les Poissons, 20 ter, rue de Bezons, F-92400 Courbevoie (FR). BONTE, Frédéric [FR/FR]; 5, place Charras, F-92400 Courbevoie (FR). DUMAS, Marc [FR/FR]; 54, rue de l'Industrie, F-92700 Colombes (FR). CHAUDAGNE, Catherine [FR/FR]; Escalier B, 57, avenue du Maréchal-Foch, F-78400 Chatou (FR).

(74) Mandataires: GIRAUD, Françoise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cédex 07 (FR).

(81) Etats désignés: CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: USE OF GINSENOSE R₀ OR A PLANT EXTRACT CONTAINING SAME TO PROMOTE COLLAGEN SYNTHESIS

(54) Titre: UTILISATION DU GINSENOSE R₀ OU D'UN EXTRAIT VEGETAL EN CONTENANT POUR STIMULER LA SYNTHÈSE DU COLLAGÈNE

(57) Abstract

The use of ginsenoside R₀ or a plant extract containing same to prepare a cosmetic or pharmaceutical composition, particularly a skin care composition, for promoting collagen synthesis, particularly collagen I and/or collagen III synthesis. Said cosmetic or pharmaceutical composition is administered to a mammal, particularly a human being, in order to promote collagen synthesis. A method for promoting collagen synthesis in fibroblast growth media is also disclosed.

(57) Abrégé

Selon l'invention, on utilise du ginsénoside R₀ ou un extrait végétal en contenant pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, destinée à la stimulation de la synthèse du collagène, en particulier du collagène I et/ou du collagène III. Cette composition cosmétique ou pharmaceutique est administrée à un mammifère, en particulier un être humain, pour la stimulation de la synthèse du collagène. L'invention concerne également un procédé pour stimuler la synthèse du collagène dans les milieux de cultures de fibroblastes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	B Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo			SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazakhstan	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CN	Chine	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
ES	Espagne	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mali	UZ	Ouzbékistan
FR	France	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Utilisation du ginsénoside R₀ ou d'un extrait végétal en contenant pour stimuler la synthèse du collagène.

L'invention concerne l'utilisation du ginsénoside R₀ et d'extraits végétaux en contenant pour la préparation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques destinées à la stimulation de la synthèse du collagène, en particulier du collagène I et du collagène III. Elle concerne également des milieux de culture de fibroblastes contenant le ginsénoside R₀ ou des extraits végétaux en contenant.

La famille des Panax est connue par ses nombreuses variétés dont les plus connues sont :

- Panax ginseng (C.A. Meyer) qui est le plus fréquemment utilisé pour ses vertus médicales,

- Panax notoginseng,
- Panax pseudo-ginseng (subsp. himalaicus),
- Panax japonicus (var. major ; var. angustifolius),
- Panax quinquefolium,
- Panax trifolius,
- Panax zingiberensis,
- Panax stipuleanatus.

Il semble que le Panax ginseng soit parmi les plus riches en saponines et les plus efficaces.

Les Panax proviennent essentiellement de trois pays :

- Japon
- Chine
- Corée.

Les variétés cultivées dans ces différentes zones peuvent être légèrement différentes et subissent des conditions géoclimatiques différentes.

On constate néanmoins par exemple que la meilleure qualité de ginseng vient de Chine, puis du Japon.

Un tubercule de ginseng atteint sa maturité en 4 à 6 ans. La qualité optimale est obtenue avec les tubercules de 6 ans.

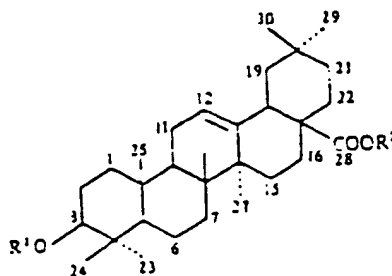
On constate des teneurs en saponines très différentes dans les différentes parties de la plante. La partie racinaire est la plus fréquemment utilisée et généralement la plus active.

La teneur la plus forte en saponines est observée dans l'extrémité de la racine (ninjin, en japonais) et dans les radicelles (hairy roots ; keninjin, en japonais).

Les saponines les plus fréquemment rencontrés dans les plantes de la famille des Panax sont de type damarane. Cependant, parmi les saponines de Panax, se trouve une saponine particulière le ginsénoside R_0 ou Chikusetsusaponine V, à structure oléanane, répondant à la formule ci-dessous :

5

10



dans laquelle :

15

le substituant R^1 en position 3 est un enchaînement de deux sucres : un bêta-D-glucuronopyranoside et un bêta-D-glucopyranosyl, représenté symboliquement par Glc A- $\underline{2}$ -Glc, et le substituant R^2 en position 28 est un bêta-D-glucopyranosyl, représenté symboliquement par Glc.

20

Ce ginsénoside est en teneur importante dans le Panax japonicus (japonais) et le P. japonicus chinois, P. japonicus var. mayor, P. japonicus var. angustifolius ainsi que cela apparaît dans la référence bibliographique ci-dessous :

25

MORITA T., KASAI R., KOHDA H., TANAKA O., ZHOU J.,
TSUNG-REN Yang.

Chemical and Morphological study on chinese Panax Japonicus C.A.
MEYER

Chem. Pharm. Bull, 1983, 31, 9-3205 - 2309.

30

Au Japon, le P. japonicus est également connu sous le nom de Chikusetsu Ninjin. La structure de la Chikusetsusaponine V a été décrite en 1971 par :

KONDO N., MARUMOTO Y., SHOJI J., Studies on the constituents of Panax Japonici Rhizoma. IV The structure of chikusetsusaponin V. Chem. Pharm. Bull. (1971) 19 (6), 1103-1107.

35

Cette molécule naturelle peut être extraite en particulier par le procédé décrit par J. SHOJI dans Advances in Chinese Medicinal Material Research 1985, p. 455 et suivantes.

On a décrit dans la littérature différentes utilisations, en particulier dans le domaine médical des ginsénosides et en particulier du ginsénoside R₀, ainsi :

5 - une activité antivirale de différents ginsénosides dont les ginsénosides R₀ est décrite par Li, Jingbo et al., dans Baiqiiien Yike Daxue Xuebao 1992, 18(1), 24-26

- une activité protectrice de l'endothélium de l'aorte du ginsénoside R₀ en association avec le ginsénoside R_b est décrite par Liao, Duanfang et al. dans Hunan Yike Daxue Huebao 1992, 17(1), 13-15

10 - le brevet JP 04 005 235, 1992, décrit l'utilisation du ginsénoside pour le traitement de l'hépatite,

- le brevet japonais JP 55 122 721 décrit l'utilisation du ginsénoside R₀ comme agent antidiabétique,

15 - Kuo S.C. et al., dans un Planta Med 1990, 56(2), 164-167, décrivent son utilisation comme agent anti-plaquettaire,

- Planta Med 1990, 56(1), 19-23, décrivent son utilisation comme agent antiinflammatoire.

Par ailleurs, différents documents décrivent l'utilisation d'extraits de Panax japonicus dans le domaine de la cosmétique. On citera à cet égard :

20 - le brevet japonais JP 61 047 411 qui décrit l'utilisation de tels extraits pour favoriser la pousse des cheveux,

- le brevet japonais JP 62 093 217 qui décrit l'utilisation d'un extrait de Panax japonicus comme tonique capillaire,

25 - le brevet japonais JP 61 289 008 qui concerne une composition cosmétique contenant un extrait de racines de Panax japonicus en combinaison avec des mucopolysaccharides.

Il a maintenant été découvert une activité surprenante du ginsénoside R₀ et des extraits végétaux en contenant, de stimulation de la synthèse du collagène, en particulier des collagènes des types I et III, ci-après dénommés en 30 abréviation respectivement "collagène I" et "collagène III", ce qui les rend particulièrement utiles pour lutter contre les effets du vieillissement cutané, ainsi que pour obtenir un raffermissment cutané, ou améliorer la cicatrisation.

35 En effet, les modifications de l'apparence et surtout des propriétés mécaniques de la peau sont dues essentiellement à des modifications des composants du derme.

Or, le collagène de type I représente 80 à 90 % du collagène cutané total, le reste étant constitué principalement de collagène de type III, c'est-à-dire environ 10 à 15 % du collagène cutané total. Les collagènes de type I et de type III sont très intimement associés pour former des fibres au sein du derme (BOREL J.P., MONBOISSE J.C., C.R.Soc. Biol. (1993), 187, 124-142 ; LAPIERE C.M., Br. J. Dermatol. (1990), 122, 5-11).

Des diminutions importantes du taux des collagènes I et III dans la peau humaine au cours du vieillissement ont été rapportées (DUMAS M., CHAUDAGNE C., BONTE F., MEYBECK A., Mech. Ageing Dev. (accepté pour publication), VITELLARO-ZUCCARELLO L, GARBELLI R., DAL POZZO ROSSI V., Cell Tissue Res., (1992), 268, 505-511). La pertinence de ces résultats est confirmée par l'observation de la diminution avec l'âge de l'expression des gènes codants pour les collagènes I et III (CHEN Y.Q., MAUVIER R., TAN E.M., UITTO J., J. Invest. Dermatol., (1993), 100, 535).

La chute du taux des collagènes I et III cutanés peut également être induite par des traitements thérapeutiques, tels que l'application topique de glucocorticoïdes (OIKARINEN A., AUTIO P., KIISTALA U., RISTELLI L., RISTELLI J., J. Invest. Dermatol., (1992), 98, 220-225).

Ainsi, quelle que soit son origine, qu'elle soit spontanée comme dans le cas du vieillissement naturel, ou qu'elle soit induite par une pathologie, par des médicaments ou par une exposition aux rayonnements ultraviolets, la diminution du taux des collagènes I et III peut être ralentie, voire stoppée grâce à la mise en oeuvre de la présente invention conduisant à une stimulation de la synthèse du collagène.

La présente invention a donc pour but principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une nouvelle formulation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, présentant une bonne efficacité sur la prévention ou le traitement des effets du vieillissement cutané, ainsi que sur le raffermissment cutané, ou pour améliorer la cicatrisation.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne l'utilisation du ginsénoside R₀ ou d'un extrait végétal en contenant pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, destinée à la stimulation de la synthèse du collagène, en particulier du collagène I et/ou du collagène III.

Suivant une variante de réalisation, la composition précitée est destinée à prévenir ou traiter les effets du vieillissement cutané, qu'il soit d'origine actinique ou spontanée (chronologique).

5 Suivant une autre variante de réalisation, la composition précitée est destinée à favoriser la formation des tissus de soutien cutané.

Suivant encore une autre variante, la composition est destinée au raffermissement de la peau.

Suivant encore une autre variante, la composition est destinée à la cicatrisation des blessures cutanées.

10 Lorsque la composition contient un extrait végétal contenant le ginsénoside R_0 , cet extrait végétal est obtenu de préférence à partir de *Panax japonicus* japonais, de *Panax japonicus* chinois, de *Panax japonicus* var. Mayor, de *Panax japonicus* var. *Angustifolius*, de préférence à partir des racines de ces plantes.

15 Suivant une variante particulièrement avantageuse de l'invention, l'extrait précité est obtenu par extraction au moyen d'un solvant polaire au reflux tel que le méthanol, à partir des racines.

Selon une autre variante, l'extrait végétal peut être obtenu à partir de racines par extraction à l'éther de pétrole, puis réextraction à l'aide d'un solvant polaire, tel que le méthanol, et précipitation par l'acétone.

20 Selon d'autres variantes de l'invention, l'extrait végétal pourra être obtenu par tout procédé permettant d'obtenir un extrait contenant au moins 1 % de ginsénoside R_0 .

25 La composition cosmétique, utilisable selon l'invention, est destinée à stimuler la synthèse du collagène, en particulier celle du collagène I et/ou du collagène III et contient à titre d'ingrédient actif une quantité cosmétiquement efficace de ginsénoside R_0 ou d'un extrait végétal en contenant.

La composition est destinée notamment à favoriser la synthèse des tissus de soutien cutané, au raffermissement de la peau et à la cicatrisation des blessures cutanées.

30 Elle est donc tout particulièrement destinée à lutter contre les effets du vieillissement cutané ou à obtenir un raffermissement cutané.

Une telle composition, par exemple, peut avantageusement être utilisée comme composition pour prévenir l'apparition des rides ou en atténuer la profondeur.

Les compositions pharmaceutiques, utilisables selon l'invention, sont destinées à améliorer la cicatrisation ou à traiter les diverses pathologies accompagnées d'une déficience en collagène.

5 Selon un autre aspect, l'invention concerne encore une méthode de traitement cosmétique ou thérapeutique, notamment dermatologique, d'un mammifère, en particulier un être humain, caractérisée en ce qu'on administre à ce mammifère, une quantité cosmétiquement ou thérapeutiquement efficace de ginsé-
10 noside R₀ ou d'un extrait végétal en contenant, pour stimuler la synthèse du collagène, en particulier du collagène I et/ou du collagène III, en particulier pour favoriser la synthèse des tissus de soutien cutané ou pour le raffermissement de la
15 peau.

 Selon un mode de réalisation avantageux de cette méthode, on administre le ginsénoside R₀ ou un extrait végétal en contenant en une quantité efficace pour améliorer la cicatrisation ou traiter les déficiences en collagène d'origines
15 diverses.

 D'autres variantes de réalisation de la méthode selon l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description prise dans son ensemble ainsi que des revendications, pour un homme de l'art.

 Dans chacun des aspects précédents, on utilisera, de préférence, des
20 concentrations en ginsénosides R₀ comprises entre 0,001 et 5 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.

 Cette concentration sera de préférence comprise entre 0,001 et 1 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.

 Selon une variante particulièrement intéressante de l'invention, la
25 composition selon l'invention contiendra en outre un extrait de Centella asiatica, de l'acide asiatique, de l'acide madécassique ou de l'asiaticoside.

 Elle pourra également comprendre avantageusement un extrait de marrons d'Inde, un extrait de petit-houx, du madécassoside, des saponines de lierre, du séricoside, des alpha-hydroxy-acides, de l'alpha-cétoglutarate, de l'acide
30 ascorbique, de la proline, de la L-hydroxyproline, de la lysine, de l'hydroxylysine, de la glycine ou de la forskoline, l'un de ses dérivés ou un extrait végétal en contenant.

 Elle pourra également comprendre avantageusement des inhibiteurs de collagénases ou des inhibiteurs de la biosynthèse de collagénases, par exemple
35 l'acide rétinolique.

Dans le cadre de l'invention, l'administration du ginsénoside R_0 ou d'un extrait végétal en contenant est réalisée selon les méthodes classiques permettant la stimulation de la synthèse du collagène. Habituellement, la voie la plus simple d'administration est la voie topique, en particulier lorsque l'on recherche la synthèse des tissus de soutien cutané, le raffermissment de la peau et la réparation des blessures cutanées.

Selon une variante avantageuse de l'invention, le ginsénoside R_0 ou un extrait végétal en contenant est incorporé dans un excipient, véhicule ou support cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, acceptable. De tels supports sont bien connus de l'homme de l'art et résultent également des exemples de compositions cosmétiques ou de compositions pharmaceutiques, notamment dermatologiques, décrites plus loin, qui ont une portée générale.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne l'utilisation du ginsénoside R_0 ou d'un extrait végétal en contenant comme agent destiné à stimuler la synthèse du collagène I et/ou du collagène III.

Elle concerne tout particulièrement l'utilisation du ginsénoside R_0 ou d'un extrait végétal en contenant comme constituant d'un milieu de culture destiné à améliorer la synthèse du collagène I et/ou du collagène III dans une culture de fibroblastes.

Cet agent peut être utilisé dans tout milieu de culture de fibroblastes, en particulier dans un milieu où les fibroblastes sont inclus dans une matrice, par exemple dans une matrice polymérique.

L'invention concerne également un procédé de stimulation de la synthèse du collagène I et/ou du collagène III consistant à introduire du ginsénoside R_0 ou un extrait végétal en contenant dans un milieu de culture de fibroblastes.

Selon ce procédé, on introduit de préférence 0,001 à 0,1 % de ginsénoside R_0 dans un milieu ci-après désigné par E 199-C, obtenu par introduction de L-glutamine à une concentration de 2mM/l dans un milieu E199 commercialisé par la société GIBCO.

Les extraits végétaux contenant le ginsénoside R_0 décrits précédemment sont également utilisables pour la préparation des milieux de culture ci-dessus.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lecture de la description explicative qui va suivre faite en référence

à plusieurs exemples donnés uniquement à titre d'illustration et qui ne sauraient par conséquent en aucun cas limiter la portée de l'invention.

Dans les exemples, les pourcentages sont exprimés en poids, sauf indication contraire. Dans le cas des extraits, les quantités de ceux-ci sont exprimées en poids sec.

Exemple 1

Préparation d'un extrait

On réalise l'extraction à partir de racines de Panax japonicus C.A. Meyer.

Après broyage des racines, l'extraction se fait avec du méthanol à reflux pendant 4 h. On obtient une pâte brune, le rendement est de 33 % environ, la teneur en ginsénoside R₀ est de 25 % environ.

Exemple 2

Préparation d'un extrait

On utilise des racines de Panax japonicus C.A. Meyer.

38,56 g des racines broyées sont extraits au soxhlet pendant 12 h avec 140-ml d'éther de pétrole.

Le résidu est réextrait au soxhlet par 130 ml de méthanol pendant 20 h.

Les 130 ml de méthanol sont concentrés sous vide à l'évaporateur rotatif de façon à ramener le volume à 45 ml.

Après refroidissement, la solution est filtrée sur Millex SR de porosité 0,45 micron.

La solution obtenue est jetée dans 500 ml d'acétone anhydre. Le précipité beige obtenu est séparé par filtration, lavé à l'acétone anhydre et séché à l'étuve à 45°C.

On obtient 6,13 g d'une poudre beige clair (rendement 15,9 %), la teneur en ginsénoside R₀ est de 35 % environ.

Exemple 3

Mise en évidence de la stimulation de la synthèse du collagène I

a) Protocole

La synthèse de collagène I est mesurée avec et sans traitement sur une culture de fibroblastes provenant d'un lifting d'une femme de 50 ans, grâce à une méthode ELISA.

a.1) Cultures de fibroblastes :

Les fibroblastes sont cultivés par la méthode des explants jusqu'à confluence, à 37°C, dans un milieu constitué d'un mélange du milieu E 199-C et de 10 % de sérum de veau foetal, dans une atmosphère saturée en humidité avec 5 % de CO₂.

Puis, après décollement par une solution isotonique tamponnée pH 7,2 de trypsine à 0,1 % et d'EDTA 0,02 %, les cellules sont ensemencées dans des microplaques 96 puits (FALCON) à 10⁴ cellules par puits dans un milieu E 199-C contenant 2 % de sérum.

Après 24 h, ce milieu est remplacé, pour une incubation de 48 h, par le même milieu sans sérum contenant 25 µM d'ascorbate de sodium (milieu d'incubation) avec ou sans les produits à tester. Les produits solubilisés dans le DMSO sont ajoutés dans le milieu de culture à différentes concentrations.

a.2) Dosage du collagène I :

La quantité du collagène I sécrété dans le milieu après 48 h d'incubation avec ou sans les produits a été déterminée à l'aide d'un test ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay).

Le milieu d'incubation est collecté et transféré dans les puits d'une plaque de microtitration (Immunoplate Nunc) contenant des inhibiteurs de protéases. Une incubation de 24 h à 4°C permet l'adhésion du collagène au plastique. Les plaques sont ensuite rincées au PBS (Phosphate Buffered Saline).

Après 24 h d'incubation à 4°C avec de la sérumalbumine pour éviter les liaisons anticorps-plastique non spécifiques, des anticorps de lapin anti-collagène I humain (Institut Pasteur, Lyon, France) sont ajoutés pendant 1,5 h à 22°C. Après rinçage au PBS, les anticorps liés sont révélés par des anticorps de chèvres anti IgG de lapin (INTERCHIM, Montluçon, France) conjugués à une phosphatase alcaline qui, en présence du phosphate de paranitrophényle, produira un paranitrophénol absorbant à 405 nm.

Les densités optiques obtenues sont converties en nanogrammes de collagène grâce à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions expérimentales avec du collagène I humain purifié (Institut Jacques Boy, France).

a.3) Interprétation statistique :

Les quantités de collagène sécrétées (moyenne \pm écart type) par les cellules traitées et non traitées sont comparées avec un test t de Student. Le seuil de 0,05 est pris comme niveau de significativité.

5 Parallèlement, la viabilité est contrôlée par un test M.T.T.

a.4) Test de viabilité cellulaire :

A la fin de la période d'incubation, le milieu est enlevé et un test M.T.T. est réalisé. Les cellules sont incubées avec 100 μ l d'une solution à 10 0,5 mg/ml d'un sel de tétrazolium dans du milieu E 199-C sans rouge de phénol pendant 3 h à 37°C. Puis, 100 μ l d'isopropanol sont ajoutés à chaque puits pour solubiliser le dérivé Formazan bleu formé par les succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. La densité optique de ce dérivé formé solubilisé est mesurée à 540 nm.

15

b) Résultats obtenus

b.1) On applique le protocole décrit précédemment pour étudier l'effet de la concentration en ginsénoside R₀ sur la stimulation de la synthèse du collagène I.

20

Le tableau 1 donne les résultats obtenus avec les compositions contenant respectivement 0, 1, 2,5 et 10 μ g de ginsénoside R₀ par ml.

Tableau 1

25

Concentration en ginsénoside R ₀ (μ g/ml)	Viabilité	ng collagène I / 10 ⁴ cell./ (48 h)	Stimulation de la synthèse
0	100	2004 \pm 132	
1	95	2172 \pm 88	+ 8 % S
2,5	100	2599 \pm 163	+ 29 % S
10	103	2889 \pm 74	+ 44 % S

Le tableau 1 met bien en évidence la stimulation de la synthèse du collagène I. (S : significatif au seuil 0,05).

b.2) Des résultats comparables ont été obtenus en partant des extraits obtenus respectivement selon l'exemple 1 et l'exemple 2 ainsi qu'avec le ginsénoside R₀.

Ces résultats sont consignés dans le tableau 2 ci-dessous.

5

Tableau 2

Produits	Conc. $\mu\text{g/ml}$	ng coll. I/ 10000FH/48 h	% stimulation/ témoin	p.
Témoin Asc. 25 μM + DMSO 0,1 %		2 466 \pm 289		
Exemple 1	1	2 805 \pm 197	+ 14 %	S (p = 0,021)
	2,5	2 888 \pm 405	+ 17 %	S (p = 0,045)
	10	3 501 \pm 307	+ 42 %	S (p = 0,003)
Exemple 2	1	3 026 \pm 412	+ 23 %	S (p = 0,0006)
	2,5	3 171 \pm 385	+ 28 %	S (p = 0,0008)
	10	3 544 \pm 310	+ 44 %	S (p = 0,0006)
Ginsénoside R ₀	1	2 482 \pm 276	+ 1 %	NS
	2,5	3 529 \pm 516	+ 43 %	S (p = 0,024)
	10	4 099 \pm 480	+ 66 %	S (p = 0,002)

10

Exemple 4**Mise en évidence de la stimulation de la synthèse du collagène III****a) Protocole :**

Le protocole est le même que celui décrit avec le collagène I sauf que
 5 le dosage ELISA est dirigé contre le collagène III (Humain) et que la durée de
 traitement des cultures est de 72 h au lieu de 48 h avec le collagène I.

b) Résultats :

En présence de R₀, la synthèse de collagène III est stimulée :
 10 à 2,5 µg/ml : + 33 %
 10 µg/ml : + 81 %.

Divers exemples également non limitatifs de composition cosmétique
 ou pharmaceutique, notamment dermatologique, sont donnés ci-après.

15 Exemple 5**Composition cosmétique favorisant la formation des tissus de soutien cutané**

	Ginsénoside R ₀	0,3 g
	Ethanol	2,0 g
20	Conservateur	0,2 g
	Gel de Carbopol 940® à 1,25 %.....qsp	100 g

Applications : 2 fois par jour, sur les zones du corps nécessitant une prévention ou
 un traitement contre l'effet de "relâchement" cutané.

25

Exemple 6**Composition cosmétique pour le raffermissment de la peau**

	Ginsénoside R ₀	0,6 g
30	Acide Hyluronique	0,1 g
	Extrait de Centella asiatica	0,4 g
	Excipient + conservateur.....qsp	100 g

Applications : 2 fois par jour en massage local pendant 4 semaines sur les zones à
 35 traiter.

Exemple 7**Pommade pour la cicatrisation des blessures cutanées**

	Ginsénoside R ₀	1 g
5	Palmitate de vitamine A	0,05 g
	Oxyde de zinc	0,1 g
	Glycérine	1 g
	Excipient pour pommade..... qsp	100 g

10 **Exemple 8****Poudre cicatrisante**

On prépare une poudre composée de particules solides complexes en suivant le procédé décrit dans le brevet français FR 2 685 635. Cette poudre a la composition suivante en poids :

- 15 - poudre de Nylon (particule support, constituée de particules de diamètre moyen d'environ 20 μm) : 97
 - ecdystérone : 1
 - ginsénoside R₀ : 2.

20 Cette poudre est appliquée en application locale sur les lésions de type ulcère 2 à 3 fois par jour, après nettoyage antiseptique des lésions.

Exemple 9**Milieu de culture favorisant la production du collagène par des fibroblastes**

25	Le milieu comprend :	
	Ginsénoside R ₀	10 mg
	Acide rétinoïque	0,3 mg
	Acide ascorbique	1,8 mg
	Proline	25 mg
30	Glycine	20 mg
	Lysine	20 mg
	Milieu E 199-C..qsp	100 ml

REVENDEICATIONS

1. Utilisation du ginsénoside R₀, ou d'un extrait végétal en contenant, pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, destinée à la stimulation de la synthèse du collagène, en particulier du collagène I et/ou du collagène III.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à prévenir ou traiter les effets du vieillissement cutané.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à favoriser la formation des tissus de soutien cutané.

4. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au raffermissment de la peau.

5. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à la cicatrisation des blessures cutanées.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la concentration en ginsénoside R₀ est comprise entre 0,001 et 5 % en poids, de préférence entre 0,001 et 1 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition contient un extrait de *Centella asiatica*, de l'acide asiatique, de l'acide madécassique, l'asiaticoside, un extrait de marrons d'Inde, un extrait de petit-houx, du madécassoside, des saponines de lierre, du séricoside, les alpha-hydroxy-acides, de l'alpha-cétoglutarate, de l'acide ascorbique, de la proline, de la L-hydroxyproline, de la lysine, de l'hydroxylysine, de la glycine ou de la forskoline, l'un de ses dérivés ou un extrait végétal en contenant.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la composition contient des inhibiteurs de collagénases ou des inhibiteurs de la biosynthèse de collagénases, par exemple de l'acide rétinoïque.

9. Utilisation du ginsénoside R₀ ou d'un extrait végétal en contenant comme agent destiné à la stimulation de la synthèse du collagène I et/ou du collagène III.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le ginsénoside R₀ ou l'extrait en contenant est utilisé comme constituant d'un milieu de culture de fibroblastes.

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ledit extrait végétal est choisi parmi les extraits de *Panax japonicus* japonais,

de *Panax japonicus* chinois, de *Panax japonicus* var. *major*, de *Panax japonicus* var. *angustifolius*.

5 12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que ledit extrait est obtenu par extraction au moyen d'un solvant polaire au reflux, tel que le méthanol, à partir de racines.

13. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que ledit extrait est obtenu à partir de racines par extraction à l'éther de pétrole puis réextraction à l'aide d'un solvant polaire, tel que le méthanol, et précipitation par l'acétone.

10 14. Méthode de traitement cosmétique d'un mammifère, en particulier un être humain, caractérisée en ce qu'on administre à ce mammifère une quantité cosmétiquement efficace de ginsénoside R_0 ou d'un extrait végétal en contenant, pour la stimulation de la synthèse du collagène, en particulier du collagène I et/ou du collagène III, en particulier pour favoriser la synthèse des tissus de soutien

15 cutané ou pour le raffermissment de la peau.

15 15. Procédé de stimulation de la synthèse du collagène I et/ou du collagène III, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire du ginsénoside R_0 ou un extrait végétal en contenant dans un milieu de culture de fibroblastes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/78 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Week 8047, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 80-83353C & JP,A,55 129 228 (OSAKA Y. K.) 7 October 1980 see abstract ---	1-15
Y	DATABASE WPI Week 8618, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 86-115969 & JP,A,61 056 114 (KANEBO KK) 20 March 1986 see abstract ---	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

- * Special categories of cited documents :
- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - 'E' earlier document but published on or after the international filing date
 - 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">6 July 1995</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center; font-size: 1.5em;">25 07. 95</p>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Stierman, B</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE WPI Week 9301, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-005487 & JP,A,4 334 308 (KANEBO KK) 20 November 1992 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>DATABASE WPI Week 9345, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-357127 & JP,A,5 262 635 (SHISEIDO CO LTD) 12 October 1993 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>FR,A,2 309 210 (MINAULT H.) 26 November 1976 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>J ETHNOPHARMACOL (SWITZERLAND), FEB 1992, VOL. 36, NO. 1, PAGE(S) 27-38, Liu CX et al 'Recent advances on ginseng research in China.' see page 30 see page 34</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>FITOTERAPIA, 1986, VOL. 57, PAGE(S) 15-28 Gezzi, A. et al 'Dermocosmetic activity of ginsenosides. Note II: Instrumental evaluation of cutaneous hydration and elasticity' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>FITOTERAPIA, 1986, VOL. 57, PAGE(S) 217-22 Curri, S. B. et al 'Dermocosmetic activity of ginsenosides. Note III: Long-term evaluation of the moisturizing and tonifying effect on the face skin' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>DATABASE WPI Week 9006, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-037334 & CN,A,1 031 023 (ZHOU XINCHU) 15 February 1989 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
P,Y	<p>FR,A,2 695 561 (LVMH RECHERCHE) 18 March 1994 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15

2

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 22, 2 December 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 239293c, TANAKA H. ET AL. 'Effect of Panax ginseng on the production of glycosaminoglycans in cultured human skin fibroblast' page 464 ;column 2 ; see abstract & FRAGRANCE J., vol.19, no.8, 1991 pages 90 - 92 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/00326

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although Claim 14 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Some substances are not adequately characterised by their pharmacological activity (e.g. as collagenase or collagenase biosynthesis inhibitors). The search has been carried out for the compounds mentioned explicitly in the claims and for the general inventive concept.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00326

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2309210	26-11-76	NONE	
FR-A-2695561	18-03-94	CA-A- 2144865	31-03-94
		EP-A- 0660698	05-07-95
		WO-A- 9406402	31-03-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No

PCT/FR 95/00326

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K31/78 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DATABASE WPI Week 8047, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 80-83353C & JP,A,55 129 228 (OSAKA Y. K.) 7 Octobre 1980 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
Y	<p>DATABASE WPI Week 8618, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 86-115969 & JP,A,61 056 114 (KANEBO KK) 20 Mars 1986 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-15

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Juillet 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.07.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Stierman, B

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DATABASE WPI Week 9301, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-005487 & JP,A,4 334 308 (KANEBO KK) 20 Novembre 1992 voir abrégé</p> <p>---</p>	1-15
Y	<p>DATABASE WPI Week 9345, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-357127 & JP,A,5 262 635 (SHISEIDO CO LTD) 12 Octobre 1993 voir abrégé</p> <p>---</p>	1-15
Y	<p>FR,A,2 309 210 (MINAULT H.) 26 Novembre 1976 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-15
Y	<p>J ETHNOPHARMACOL (SWITZERLAND), FEB 1992, VOL. 36, NO. 1, PAGE(S) 27-38, Liu CX et al 'Recent advances on ginseng research in China.' voir page 30 voir page 34</p> <p>---</p>	1-15
Y	<p>FITOTERAPIA, 1986, VOL. 57, PAGE(S) 15-28 Gezzi, A. et al 'Dermocosmetic activity of ginsenosides. Note II: Instrumental evaluation of cutaneous hydration and elasticity' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-15
Y	<p>FITOTERAPIA, 1986, VOL. 57, PAGE(S) 217-22 Curri, S. B. et al 'Dermocosmetic activity of ginsenosides. Note III: Long-term evaluation of the moisturizing and tonifying effect on the face skin' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-15
Y	<p>DATABASE WPI Week 9006, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-037334 & CN,A,1 031 023 (ZHOU XINCHU) 15 Février 1989 voir abrégé</p> <p>---</p>	1-15
2 P,Y	<p>FR,A,2 695 561 (LVMH RECHERCHE) 18 Mars 1994 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-15

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

de Internationale No

PCT/FR 95/00326

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2309210	26-11-76	AUCUN	
FR-A-2695561	18-03-94	CA-A- 2144865 EP-A- 0660698 WO-A- 9406402	31-03-94 05-07-95 31-03-94

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 22, 2 Décembre 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 239293c, TANAKA H. ET AL. 'Effect of Panax ginseng on the production of glycosaminoglycans in cultured human skin fibroblast' page 464 ;colonne 2 ; voir abrégé & FRAGRANCE J., vol.19, no.8, 1991 pages 90 - 92</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que la revendication 14 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. Les revendications n^{os} 8 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
Des substances ne sont pas suffisamment caractérisées par leur activité pharmacologique (e.g. comme inhibiteurs de collagenase ou de la biosynthèse de collagenase). La recherche a été effectuée pour les compositions mentionnées explicitement dans les revendications et pour l'idée inventive générale.
3. Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}:

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.